

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JCS58 U.S. PTO  
09/715035  
11/20/00

In re PATENT APPLICATION of  
Inventor(s): MÖCKEL et al.

Appln. No.: 09  
Series Code ↑ Serial No. ↑

Group Art Unit: Not Yet Assigned

Filed: November 21, 2000

Examiner: Not Yet Assigned

Title: NOVEL NUCLEOTIDE SEQUENCES ENCODING THE  
PFKA GENE

Atty. Dkt. PM 274441  
M# 990169BT-  
pat/SW  
Client Ref

Date: November 20, 2000

**SUBMISSION OF PRIORITY  
DOCUMENT IN ACCORDANCE  
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
100 11 922.0	GERMANY	11 March 2000

Respectfully submitted,

Pillsbury Madison & Sutro LLP  
Intellectual Property Group

1100 New York Avenue, NW  
Ninth Floor  
Washington, DC 20005-3918  
Tel: (202) 861-3000  
Atty/Sec: ASH/JRH

By Atty: Ann S. Hobbs Reg. No. 36830  
Sig: [Signature] Fax: (202) 822-0944  
Tel: (202) 861-3063



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 100 11 922.0

**Anmeldetag:** 11. März 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa-Hüls Aktiengesellschaft, Frankfurt  
am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidse-  
quenzen

**Priorität:** 23.11 1999 DE 199 56 133.8

**IPC:** C 07 H, C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. September 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**Dzierzon**

### Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das pfkA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das pfkA-Gen verstärkt wird.

#### Stand der Technik

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, insbesondere aber in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Lysin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem

man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)).

15

20

25

### Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

### 5 Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte  
10 Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base, sondern auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das  
20 die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

25 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 5 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

15 ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 6, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält

20 ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor

und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

25 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthalten, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon

30 enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Phosphofructokinase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Phosphofructokinase-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die für Phosphofructokinase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Phosphofructokinase und auch solche ein, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine Aminosäure produzieren, und in denen die für das pfkA-Gen codierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind die zum Beispiel bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067



Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw.  
Stämme, wie beispielsweise

- 5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
- Brevibacterium flavum FERM-P 1708
- Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
- Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
- Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
- 10 Corynebacterium glutamicum DSM5715.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym  
Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierende pfkA-Gen von  
C. glutamicum zu isolieren.

- Zur Isolierung des pfkA-Gens oder auch anderer Gene von C.  
15 glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses  
Mikroorganismus in E. coli angelegt. Das Anlegen von  
Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und  
Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das  
Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in  
20 die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland,  
1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular  
Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory  
Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die  
des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell  
25 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et  
al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996)  
beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die  
mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987,  
Proceedings of the National Academy of Sciences USA,  
30 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,  
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.  
Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326  
(1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum  
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHc79 (Hohn und

Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc $r$ , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen *pfkA* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *pfkA*-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar

stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

10 In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich  
15 aus SEQ ID NO 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter  
20 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  
25 findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach  
30 Überexpression des pfkA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die

Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Lysin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße pfkA-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert.

Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte

Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den  
5 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet  
10 werden.

Weiterhin eignen sich solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and  
15 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum  
20 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-  
25 84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen  
30 enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur  
35 Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362

(1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der  
5 resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben dem pfkA-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges,  
10 der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken oder zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus  
15 der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335), oder
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of  
20 Bacteriology 174:6076-6086), oder
- das für die Triosephosphat Isomerase codierende tpi-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase codierende pgk-Gen  
25 (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- 30 • das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222)

überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben dem pfkA-Gen gleichzeitig

- 5 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen (DE 199 50 409.1 DSM 13047) und/oder
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen (US 09/396,478, DSM 12969)

abzuschwächen.

- 10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des pfkA-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products,
- 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder
- 20 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik
- 25 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
- 30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,

1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen



aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die  
5 Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an Lysin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Lysin kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender  
10 Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Das pfkA-Gen findet sich hinterlegt in dem Stamm DSM 5715  
15 unter der Bezeichnung DSM 5715/pT-pfkAexp, registriert unter der DSM 13253.

## Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

### 5 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC 13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion

des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

## Beispiel 2

### Isolierung und Sequenzierung des pfkA-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring

Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, 5 Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit 10 dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic 15 Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF 20 Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter 25 Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 30 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, 35 USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1029 Basenpaaren, welches als pfkA-Gen bezeichnet wurde. Das pfkA-Gen kodiert für ein Protein  
5 von 343 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 990169 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1274

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (143)..(1171)

25

&lt;400&gt; 1

gtcgatttgt taatgaaact gcagctctgg cgattaaata agatggtcag agacagtttt 60

ttggcctgtc aaccctgtg attctcttat ttttgggtga ttgttcgggc gcgggtgttg 120

30

tgatgggttt aatatggaag ac atg cga att gct act ctc acg tca ggc ggc	172
Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly	
1 5 10	

35

gac tgc ccc gga cta aac gcc gtc atc cga gga atc gtc cgc aca gcc	220
Asp Cys Pro Gly Leu Asn Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala	
15 20 25	

40

agc aat gaa ttt ggc tcc acc gtc gtt ggt tat caa gac ggt tgg gaa	268
Ser Asn Glu Phe Gly Ser Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu	
30 35 40	

45

gga ctg tta ggc gat cgt cgc gta cag ctg tat gac gat gaa gat att	316
Gly Leu Leu Gly Asp Arg Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile	
45 50 55	

50

gac cga atc ctc ctt cga ggc ggc acc att ttg ggc act ggt cgc ctc	364
Asp Arg Ile Leu Leu Arg Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu	
60 65 70	

55

cat ccg gac aag ttt aag gcc gga att gat cag att aag gcc aac tta	412
His Pro Asp Lys Phe Lys Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu	
75 80 85 90	

gaa gac gcc ggc atc gat gcc ctt atc cca atc ggt ggc gaa gga acc	460
Glu Asp Ala Gly Ile Asp Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr	
95 100 105	

	ctg aag ggt gcc aag tgg ctg tct gat aac ggt atc cct gtt gtc ggt	508
	Leu Lys Gly Ala Lys Trp Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly	
	110 115 120	
5	gtc cca aag acc att gac aat gac gtg aat ggc act gac ttc acc ttc	556
	Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe	
	125 130 135	
10	ggt ttc gat act gct gtg gca gtg gct acc gac gct gtt gac cgc ctg	604
	Gly Phe Asp Thr Ala Val Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu	
	140 145 150	
15	cac acc acc gct gaa tct cac aac cgt gtg atg atc gtg gag gtc atg	652
	His Thr Thr Ala Glu Ser His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met	
	155 160 165 170	
20	ggc cgc cac gtg ggt tgg att gct ctg cac gca ggt atg gcc ggc ggt	700
	Gly Arg His Val Gly Trp Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly	
	175 180 185	
25	gct cac tac acc gtt att cca gaa gta cct ttc gat att gca gag atc	748
	Ala His Tyr Thr Val Ile Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile	
	190 195 200	
30	tgc aag gcg atg gaa cgt cgc ttc cag atg ggc gag aag tac ggc att	796
	Cys Lys Ala Met Glu Arg Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile	
	205 210 215	
35	atc gtc gtt gcg gaa ggt gcg ttg cca cgc gaa ggc acc atg gag ctt	844
	Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu	
	220 225 230	
40	cgt gaa ggc cac att gac cag ttc ggt cac aag acc ttc acg gga att	892
	Arg Glu Gly His Ile Asp Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile	
	235 240 245 250	
45	gga cag cag atc gct gat gag atc cac gtg cgc ctc ggc cac gat gtt	940
	Gly Gln Gln Ile Ala Asp Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val	
	255 260 265	
50	cgt acg acc gtt ctt ggc cac att caa cgt ggt gga acc cca act gct	988
	Arg Thr Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala	
	270 275 280	
55	ttc gac cgt gtt ctg gcc act cgt tat ggt gtt cgt gca gct cgt gcg	1036
	Phe Asp Arg Val Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala	
	285 290 295	
60	tgc cat gag gga agc ttt gac aag gtt gtt gct ttg aag ggt gag agc	1084
	Cys His Glu Gly Ser Phe Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser	
	300 305 310	
65	att gag atg atc acc ttt gaa gaa gca gtc gga acc ttg aag gaa gtt	1132
	Ile Glu Met Ile Thr Phe Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val	
	315 320 325 330	

```

cca ttc gaa cgc tgg gtt act gcc cag gca atg ttt gga tagtttttcg 1181
Pro Phe Glu Arg Trp Val Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
          335                      340

5
ggctttttatc aacagccaat aacagctctt tcgccattg aggtggaggg gctgtttttt 1241
catgccgtaa ggaaagtgca agtaagtgaa atc 1274

10
<210> 2
<211> 343
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

15
<400> 2
Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly Leu Asn
  1             5             10             15

20
Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe Gly Ser
          20             25             30

Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu Gly Leu Leu Gly Asp Arg
          35             40             45

25
Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu Leu Arg
  50             55             60

Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu His Pro Asp Lys Phe Lys
  65             70             75             80

30
Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly Ile Asp
          85             90             95

35
Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala Lys Trp
          100            105            110

Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly Val Pro Lys Thr Ile Asp
          115            120            125

40
Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val
          130            135            140

Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu His Thr Thr Ala Glu Ser
          145            150            155            160

His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met Gly Arg His Val Gly Trp
          165            170            175

50
Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr Val Ile
          180            185            190

Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met Glu Arg
          195            200            205

55
Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala Glu Gly
          210            215            220

```



Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Glu Gly His Ile Asp  
 225 230 235 240  
 5 Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile Ala Asp  
 245 250 255  
 Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val Arg Thr Thr Val Leu Gly  
 260 265 270  
 10 His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val Leu Ala  
 275 280 285  
 Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala Cys His Glu Gly Ser Phe  
 290 295 300  
 15 Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile Thr Phe  
 305 310 315 320  
 20 Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg Trp Val  
 325 330 335  
 Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly  
 340  
 25

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus  
5 der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens  
70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von  
SEQ ID No.2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - e) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz  
von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
20 wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien  
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,  
25 enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1  
dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2,  
enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in  
30 SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Codes entspricht, oder
  - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur  
Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz  
hybridisiert, und gegebenenfalls
  - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das  
für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz  
in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die L-Aminosäure produzierenden  
coryneformen Bakterien, in denen man zumindest  
das pfkA-Gen oder dafür codierende  
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
überexprimiert.
  - b) Anreicherung von der L-Aminosäure im Medium oder  
in den Zellen der Bakterien und
  - c) Isolieren von der L-Aminosäure.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich  
weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-  
Aminosäure verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen die  
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet  
sind, die die Bildung des L-Lysins verringern.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten  
Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das  
5 pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenz trägt.
11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 7  
bis 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Lysin  
10 herstellen.
12. Verfahren gemäß Anspruch 6,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man für die Herstellung von Lysin Bakterien  
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder  
15 mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende dapA-Gen,
- 12.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-  
Gen,
- 20 12.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende  
tpi-Gen,
- 12.4 das Gen für die Succinyldiaminopimelat-  
Desuccinylase kodierende dapE-Gen,
- 12.5 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat  
25 Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 12.6 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende  
pgk-Gen,
- 12.7 das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen,  
gleichzeitig verstärkt, insbesondere überexprimiert oder  
30 amplifiziert.

13. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man für die Herstellung von L-Lysin Bakterien  
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder  
5 mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 13.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
codierende pck-Gen
- 13.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase  
kodierende pgi-Gen
- 10 14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium  
glutamicum einsetzt.
- 15 15. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1  
als Primer zur Herstellung der DNA von Genen, die für  
die für die Phosphofructokinase codieren, durch die  
Polymerase-Kettenreaktion.
16. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1  
20 als Hybridisierungssonden.

## Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenzen

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,  
5 enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 10 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No.2,
- 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- 20 Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verstärkung des pfkA-Gen's und die Verwendung als Primer oder Hybridisierungssonde.